

# Phosphoinositides, aging and Alzheimer's disease

Citation for published version (APA):

Bothmer, J. (1992). *Phosphoinositides, aging and Alzheimer's disease*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19921126jb>

**Document status and date:**

Published: 01/01/1992

**DOI:**

[10.26481/dis.19921126jb](https://doi.org/10.26481/dis.19921126jb)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## CHAPTER 11

---

### SUMMARY AND CONCLUDING REMARKS.

---

J. Bothmer

**SUMMARY AND CONCLUDING REMARKS.**

The aim of this thesis was to provide more information about the neurochemical changes that occur in the brain with age and Alzheimer's disease (AD). Inositol phospholipids and diacylglycerol phosphorylation were chosen as neurochemical parameters because of their involvement in various important cell functions, such as receptor-mediated signal transduction and calcium release, but also mitogenic signalling and the regulation of protein kinases. Several investigators have described age-related changes in phosphoinositide metabolism and their possible involvement in the age-related decline in cell function. Phosphoinositide metabolism also seems to be involved in AD, as AD-related changes at different levels of the phosphoinositide cascade have been reported. However, phosphatidylinositol (PI) kinase, phosphatidylinositol phosphate (PIP) kinase and diacylglycerol (DAG) kinase have not been studied with respect to aging and AD up to now, even there is enough evidence that these enzymes could be affected.

**- Experiments with rat brain material**

PI, PIP and DAG kinase activities were studied in cytosolic, salt-solubilized and Triton-solubilized protein fractions of rat brain cortex as a function of age. This crude purification was used to differentiate between the different enzymes and enzyme subtypes, each of which have their own subcellular localization. There appeared to be no, or only minor, age-related changes in the formation of PIP, PIP<sub>2</sub> and PA after addition of exogenous substrate (chapter 6).

However, when endogenous lipids were used as substrate, PIP<sub>2</sub> formation was decreased in the frontal cortex. PA formation was also decreased in almost all brain regions tested (chapter 5). The enzyme/endogenous substrate fraction used for this study was a membrane-cytosol preparation containing plasma membranes and cytosol obtained from a fraction enriched in synaptosomes. The kinases in this fraction are probably still associated with the membrane, as they are *in vivo*, and in direct contact with their substrates PI, PIP and DAG. Therefore, the age-related changes in PIP kinase activity and DAG kinase activity found in this fraction of rat brain, in contrast to the lack of changes in an assay system with solubilized proteins and exogenous lipid substrate, could be due to changes in the properties of the membrane. As elaborated in chapter 1, age-related changes in the physical properties of membranes can result in changes in the activity of enzymes attached to this membrane (Naeim and Walford, 1985); however, we did not measure the correlation between enzyme activity and membrane fluidity.

A decrease in endogenous substrate availability could also have caused the decrease in PIP<sub>2</sub> and PA formation. It is possible that basal PLC activity is decreased as a result of the age-related changes in membrane properties. This would result in a decreased hydrolysis of PIP<sub>2</sub> and a decreased supply of DAG.

This in turn would result in a decreased formation of PA in our phosphorylation assay. In addition, decreased PIP<sub>2</sub> hydrolysis would result in an increased level of PIP<sub>2</sub>, which can inhibit PIP kinase activity by product feedback inhibition (Van Rooijen et al., 1985).

In conclusion, PI, PIP and DAG kinase activities are not affected by age in the rat brain. The age-related changes measured in the membrane cytosol preparation with endogenous lipids as substrates could be a reflection of the age-related changes in the physical properties of the membrane. Thus, the age-related changes in phospholipid phosphorylation rates reported in this thesis cannot explain the age-related changes in receptor-mediated inositol phospholipid hydrolysis reported by other investigators, as suggested in chapter 1. These data are therefore consistent with the membrane hypothesis of aging (Naeim and Walford, 1985). The main concept of this hypothesis is that the membrane shows an age-associated increase in microviscosity, which correlates with an increase in the cholesterol/phospholipid ratio. A less fluid membrane would result in a decline in the functioning of membrane-bound enzymes, receptors and ion channels, and, ultimately, in a decline in cell function.

In these aging studies, groups of Brown-Norway rats of different age were used. Young Brown-Norway rats showed no, or only minor, differences compared with Sprague-Dawley and Wistar rats with respect to PI, PIP and DAG kinase activities in a membrane-cytosol preparation (results not shown). Because of the high inter-experimental and inter-individual variation in phosphorylation (with the membrane-cytosol preparation as enzyme/lipid substrate fraction), several variables in the preparation of the enzyme/lipid substrate fraction and the phosphorylation assay were tested. After the influence of each variable on the ultimately measured kinase activities had been evaluated, a value was chosen which was kept constant in following studies. These studies on the experimental variables revealed some interesting data.

First, the effect of time variation within experiments appeared to be very important for the different kinases, which were affected in different ways. Chapter 2 shows that the effect of time variation is dependent on the phase of the subcellular fractionation procedure. After decapitation, which is regarded as a form of global cerebral ischaemic insult, PLC activity is activated in both brain tissue as well as brain homogenate, probably as a result of higher intra-cellular calcium concentrations under such conditions (Sun et al., 1990). The high levels of DAG formed under these conditions explain the increased PA formation and the decreased PIP<sub>2</sub> formation (chapter 2) as PIP (substrate for PIP<sub>2</sub> formation) is also hydrolysed with increasing post-mortem delay (Dawson and Eichberg, 1965). A delay after the subcellular fractionation or before the phosphorylation assay is characterized by low calcium concentrations. The rates of PIP<sub>2</sub> and PA formation appeared to be decreased and the rate of PIP formation increased. This is probably due to phosphomonoesterase activity increasing the level of PI (Jolles et al., 1981).

Chapter 3 shows that the amount of PIP<sub>2</sub> ultimately formed in the phosphorylation assay decreases markedly with prolonged preincubation times. PA and PIP formation were not affected by changes in preincubation time. This

could be an effect of increased phosphomonoesterase activity; however, if this were so, PIP formation would be expected to be increased. Another mechanism for this phenomenon could be a regulation by protein phosphorylation, as Jolles et al. (1980) reported a relationship between phosphoinositide phosphorylation and protein phosphorylation. A comparable protein fraction also showed an analogous decrease in the phosphorylation of some membrane proteins (Dunkley and Robinson, 1981).

Second, chapter 5 shows that there are regional differences in PI, PIP and DAG kinase activities in the rat brain. These differences probably reflect a regional distribution of PLC activity. This is because the rates of PIP<sub>2</sub> and PA formation, measured in seven rat brain regions, showed an inverse correlation. A high basal PLC activity would result in high levels of DAG and, consequently, in an increased formation of PA in the phosphorylation assay used. In addition, a high basal PLC activity would result in decreased levels of PIP and PIP<sub>2</sub> and, consequently, in lower rates of PIP<sub>2</sub> formation in the phosphorylation assay. However, no studies on regional differences in basal PLC activity in rat brain have been reported up to now.

Third, a study of the subcellular distribution of endogenous lipid phosphorylation activities (chapter 4) revealed an unidentified phosphorylated inositol phospholipid, specifically located in the mitochondrial fraction. The unknown inositol phospholipid was not phosphatidylinositol trisphosphate or lyso-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, as judged from the elution profiles on Dowex anion-exchange columns. It could be a phosphatidylinositol bisphosphate isomer, a glycosyl-phosphoinositide or a phosphatidylinositol pyrophosphate. The formation of phosphatidylinositol pyrophosphates can be catalysed non-enzymically by bivalent metal ions (Gumber and Lowenstein, 1986). Because mitochondria contain high levels of Ca<sup>2+</sup> a substance such as PI 4-pyrophosphate could be formed. PI-4-pyrophosphate has a R<sub>f</sub> value on TLC similar to that of the unknown inositol phospholipid. HPLC analysis of the chemically hydrolysed inositol phosphate head-group or even NMR analysis is needed to identify this unknown inositol phospholipid.

#### **- Experiments with human brain material**

PI kinase activity in cytosolic preparations of normal human brain cortex appeared to decrease with age, whereas PIP kinase activity showed no age-related change (chapter 8). These enzyme activities were analysed with exogenous lipids as substrate. These findings are in contrast to the findings in rat brain cortex, where no age-related differences were found (chapter 6). This discrepancy between rats and humans can be ascribed to various factors. First, species differences may provide an explanation. Although the rat is regarded as a valid model for age-related changes in physiological parameters in man, various processes are known to be different in aging rats than in aging humans. It can be questioned whether the aging rat can be regarded as a valid model for pathological brain aging in humans (AD). Second, environmental influences

may affect the aging organism. The fact that old people are more likely to have been exposed to biological life events than young people and than rats, which are kept under standardized conditions and are well-cared for, may also underlie the difference in inositol phospholipid metabolism in aging rats and humans. Biological life events are factors other than severely impairing conditions like dementia that damage optimal brain functioning (Houx et al., 1991). Aged rats of an inbred strain kept under standardized conditions without almost any damaging influence of the environment are, therefore, possibly not an adequate model for human aging. However, mimicking human biological life events in rats as a model for human aging would probably meet with ethical problems. The use of animals that have been used in other studies, in which for example the animals were anaesthetized, should be taken into consideration.

In cytosolic preparations of brain cortex of AD patients, PI kinase activity appeared to be decreased as compared with that of age-matched control subjects. PIP kinase activity was not altered (chapter 7). No age-related decline in PI kinase activity and PIP kinase activity could be detected in the AD patient group (chapter 8). However, AD patients with an "age of first symptoms" above 75 years had a higher PI kinase activity (comparable to control values) than AD patients with an "age of first symptoms" below 75 years. These results suggest that PI kinase activity can be used to differentiate AD patients into subgroups, characterized by a difference in the age of onset of AD. This interesting finding could be interpreted as an indication for heterogeneity in Alzheimer's disease, in line with the results of an earlier study (Rossor et al., 1984) in which enzyme activities were found to differ in old and young AD patients. The present results suggest that more research should be performed into the biochemical differentiation of AD subtypes.

The decline in PI kinase activity in AD is probably not caused by the presence of an inhibitory compound in AD cytosol, for instance metal ions, or by the loss of a soluble activating compound in AD cytosol, for instance cofactors, because chelation experiments and experiments in which AD cytosol and control cytosol were combined did not reveal inhibition or stimulation of PI kinase activity (chapter 9). PI kinase can be divided into at least three subtypes (Carpenter and Cantley, 1990), each with a different subcellular localization, adenosine sensitivity, detergent sensitivity, and supposed function. The greatest decline in PI kinase activity was found in the cytosolic fractions. The PI kinase activity in these fractions was inhibited by Triton X-100 and was relatively insensitive to adenosine, in contrast to the PI kinase activity in integral membrane protein fractions, which was stimulated by Triton X-100 and inhibited by adenosine. The PI kinase in the cytosolic fraction has the characteristics of type 1 PI kinase, or PI 3-kinase, suggesting that this PI 3-kinase could be specifically affected in AD. Identification of the products of the PI kinases in AD and control brains will reveal the ultimate proof of identity. These experiments will be done in future studies.

If type 1 PI kinase, or PI 3-kinase, is specifically affected in AD, then protein tyrosine kinase activity could be involved. Several receptors which induce

cytoskeletal rearrangements in the cell after stimulation contain intrinsic protein tyrosine kinase activity (listed in chapter 1). Activation of these receptors results in stimulation of protein tyrosine activity, resulting in the coupling and activation of PI 3-kinase and cytoskeletal rearrangements. This possible involvement of PI 3-kinase and protein tyrosine kinase in the regulation of cytoskeletal rearrangements, together with the decline in PI kinase activity (chapter 7) and tyrosine kinase activity (Shapiro et al., 1991) in AD patients, suggests that these enzymes may be involved in the cellular pathology of AD. This is because neurofibrillary tangles, which are a prominent feature of AD, are composed predominantly of wrongly metabolized cytoskeletal components.

There is growing evidence that AD may be a systemic disease and not just a disease with central effects. For this reason, PI kinase activity was measured in blood platelets from AD patients and age-matched controls. Platelets were chosen because disease-specific abnormalities in the brain, such as those occurring in diseases like Parkinson's disease, Huntington's disease, and depression, are also detected in platelets (Bush et al., 1991). Furthermore, platelets contain a complete phosphoinositide-metabolizing system, including type 1 or PI 3-kinase, and are easy to obtain. However, we did not find any difference between the PI kinase activities of platelets obtained from AD patients and control subjects. More research into the PI kinase activities present in peripheral tissues and cells should be performed to be able to conclude whether the changes in the brain cortex are reflected systemically.

In conclusion, the results in this thesis provide new information about the neurochemical basis of brain aging and AD. Three enzymes of phosphoinositide metabolism, phosphatidylinositol kinase, phosphatidylinositol phosphate kinase and diacylglycerol kinase, appeared to be affected in aging and/or AD. The micro-environment of these enzymes appeared to be important for their activity. Therefore, the operationalization used in this thesis with a differentiation in measuring kinase activities as a function of age with and without their microenvironment was essential. In addition, the decrease in type 1 PI kinase activity in AD, in view of the proposed relation between this kinase activity and cytoskeletal turnover processes, could be relevant to the cellular pathology of AD.

## References.

- Bush A.L., Beyreuther K., and Masters C.L. (1991) Circulating forms of amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. In: *Alzheimer's disease: Basic mechanisms, diagnosis and therapeutic strategies* (Iqbal K., McLachlan D.R.C., Winblad B., and Wisniewski H.M., eds.), pp. 353-358. J.Wiley & Sons, Chichester, England.
- Carpenter C.L., and Cantley L.C. (1990) Phosphoinositide kinases. *Biochemistry* **29**, 11147-11156.
- Dawson R.M.C., and Eichberg J. (1965) Diphosphoinositide and triphosphoinositide in animal tissue. Extraction, estimation and changes post mortem. *Biochem. J.* **96**, 634-643.
- Dunkley P.R., and Robinson P.J. (1981) Calcium stimulated protein kinases from rat cerebral cortex are inactivated by preincubation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **102**, 1196-1202.
- Gumber S.C., and Lowenstein J.M. (1986) Non-enzymic phosphorylation of poly-phosphoinositides and phosphatidic acid is catalysed by bivalent metal ions. *Biochem. J.* **235**, 617-619.
- Houx P.J., Vreeling F.W., and Jolles J. (1991) Age-associated cognitive decline is related to biological



- live events. In: *Alzheimer's disease: Basic mechanisms, diagnosis and therapeutic strategies* (Iqbal K., McLachlan D.R.C., Winblad B., and Wisniewski H.M., eds.), pp. 353-358. J.Wiley & Sons, Chichester, England.
- Jolles J., Zwiers H., Van Dongen C.J., Schotman P., Wirtz K.W.A., and Gispen W.H. (1980) Modulation of brain poly-phosphoinositide metabolism by ACTH-sensitive protein phosphorylation. *Nature* **286**, 623-625.
- Jolles J., Schrama L.H., and Gispen W.H. (1981) Calcium dependent turnover of brain polyphosphoinositides in vitro after prelabeling in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **666**, 90-98.
- Naeim F., and Walford R.L. (1985) Aging and cell membrane complexes: The lipid bilayer, integral proteins, and cytoskeleton. In: *Handbook of the biology of aging* (Finch C.E., and Schneider E.L., eds.), pp. 272-289. Van Nostrand Reinhold, N.Y.
- Rossor M.N., Iverson L.L., Reynolds G.P., Mountjoy C.Q., and Roth M. (1984) Neurochemical characteristics of early and late onset types of Alzheimer's disease. *Clin. Res.* **288**, 961-964.
- Shapiro I.P., Masliah E., and Saitoh T. (1991) Altered protein tyrosine phosphorylation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **56**, 1154-1162.
- Sun G.Y., Yoa F.-G., and Lin T.-N. (1990) Degradation of poly-phosphoinositides in brain subcellular membranes in response to decapitation insult. *Neurochem. Int.* **17**, 529-535.
- Van Rooijen L.A.A., Rossowska M., and Bazan N.G. (1985) Inhibition of phosphatidylinositol 4-phosphate kinase by its product phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 150-155.





## SAMENVATTING EN CONCLUSIES

De doelstelling van het onderzoek beschreven in dit proefschrift, was meer informatie te verkrijgen over neurochemische veranderingen die plaatsvinden in de hersenen tijdens veroudering en de ziekte van Alzheimer (AD). De fosforyleringen van inositol fosfolipiden en diacylglycerol werden gekozen als neurochemische parameters omdat deze betrokken zijn bij verschillende belangrijke celfuncties zoals receptor gemedieerde signaal transductie en het vrijmaken van calcium, maar tevens bij mitogene signaal overdracht en de regulatie van eiwit kinases. Leeftijdsafhankelijke veranderingen in het inositol fosfolipiden metabolisme en de mogelijke betrokkenheid van deze veranderingen bij de leeftijdsgerelateerde afname in het functioneren van de cel zijn door meerdere onderzoekers beschreven. Het inositol fosfolipiden metabolisme lijkt ook betrokken te zijn bij de ziekte van Alzheimer, omdat op verschillende nivo's van de fosfoinositiden cascade veranderingen zijn waargenomen, die aan de ziekte van Alzheimer zijn gerelateerd. De enzymen fosfatidylinositol (PI) kinase, fosfatidylinositol fosfaat (PIP) kinase en diacylglycerol (DAG) kinase zijn echter nog niet onderzocht in relatie tot veroudering en AD, hoewel er voldoende aanwijzingen zijn dat deze enzymen veranderd zouden kunnen zijn.

- Experimenten met hersen materiaal van de rat

PI, PIP en DAG kinase activiteiten werden gemeten in relatie tot de leeftijd, in cytosolaire, zout-gesolubiliseerde en Triton-gesolubiliseerde eiwit fracties van de hersen cortex van de rat. Deze ruwe zuivering werd toegepast om onderscheid te maken tussen de verschillende enzymen en hun sub-types welke allemaal hun eigen subcellulaire localisatie hebben. In dit experiment waarbij exogeen substraat werd toegevoegd, werden geen, of maar zeer kleine, aan de leeftijd gerelateerde veranderingen gevonden in de mate van PIP, PIP<sub>2</sub> en PA vorming (Hoofdstuk 6).

Als endogeen aanwezige lipiden als substraat werden gebruikt, nam in de frontale cortex de vorming van PIP<sub>2</sub> af met de leeftijd. De vorming van fosfatide zuur (PA) uit DAG nam in dit geval in bijna alle bestudeerde hersen regio's af met de leeftijd (Hoofdstuk 5). De voor deze studie gebruikte enzym/endogeen substraat fractie bestond uit een membraan-cytosol preparaat verkregen uit een fractie verrijkt aan synaptosomen. De kinases in deze fractie zijn waarschijnlijk nog gebonden aan de membraan en staan in direct contact met hun substraten PI, PIP en DAG, vergelijkbaar met de in vivo situatie. De aan de leeftijd gerelateerde verschillen in PIP kinase en DAG kinase activiteit in deze fractie, in tegenstelling tot de assay met gesolubiliseerde eiwitten en exogeen substraat waarin geen verschillen werden gevonden, worden dus mogelijk veroorzaakt door veranderingen in de eigenschappen van de membraan. Veranderingen in de fysische eigenschappen van de membraan als functie van de leeftijd kunnen,

zoals beschreven in hoofdstuk 1, de activiteit van membraan-gebonden enzymen beïnvloeden (Naeim en Walford, 1985). Wij hebben echter geen correlatie bepaald tussen enzym activiteiten en, bijvoorbeeld, membraan vloeibaarheid.

De afname in  $\text{PIP}_2$  en PA vorming met de leeftijd kan ook veroorzaakt worden door een afname in de hoeveelheid endogeen substraat. De niet gestimuleerde PLC activiteit kan afgenomen zijn ten gevolge van leeftijds afhankelijke veranderingen in de eigenschappen van de membraan. Dit zou dan resulteren in een verlaagde hydrolyse van  $\text{PIP}_2$  en een verlaagd aanbod van DAG. In de in dit proefschrift beschreven fosforylerings assay leidt een verlaagd aanbod van DAG tot een verlaagde vorming van PA. Een verlaagde  $\text{PIP}_2$  hydrolyse leidt tot een toename in de hoeveelheid  $\text{PIP}_2$ , met als mogelijk resultaat de remming van PIP kinase door produkt inhibitie (Van Rooijen et al., 1985).

De conclusie uit het voorgaande is dat de PI, PIP en DAG kinase activiteiten in ratte hersenen niet veranderen als functie van de leeftijd. De leeftijds gerelateerde veranderingen gemeten in het membraan-cytosol preparaat met endogene fosfolipiden als substraat zijn waarschijnlijk een afspiegeling van de leeftijds gerelateerde veranderingen in de fysische eigenschappen van de membraan. Deze leeftijds gerelateerde veranderingen in fosfolipiden fosforylerings ratio's kunnen de door andere onderzoekers beschreven leeftijds gerelateerde veranderingen in receptor gemedieerde inositol fosfolipiden hydrolyse dus niet verklaren, zoals gesuggereerd werd in Hoofdstuk 1. Deze gegevens stroken met de membraan hypothese voor veroudering (Naeim en Walford, 1985). Het hoofdpunt van deze hypothese is de leeftijds gerelateerde toename in de micro-viscositeit van de membraan, welke correleert met een toename in de cholesterol/fosfolipiden ratio. Een lagere membraan vloeibaarheid zou resulteren in een afname in het functioneren van membraan gebonden enzymen, receptoren en ion kanalen, en uiteindelijk in een afname in het functioneren van de cel.

In de beschreven verouderings studies zijn Brown-Norway ratten van verschillende leeftijden gebruikt. Jonge Brown-Norway ratten vertonen geen, of nauwelijks, verschillen met Sprague-Dawley en Wistar ratten met betrekking tot PI, PIP en DAG kinase activiteiten in een membraan cytosol preparaat van de hersenen (resultaten niet getoond). Omdat de inter-experimentele en inter-individuele variatie in fosforylerings nivo (met membraan/cytosol preparaat als enzym/substraat fractie) te hoog bevonden werd, werden verschillende variabelen binnen de bereiding van de enzym/lipide substraat fractie en binnen de fosforylerings assay getest. Na meting van het effect van een variabele op de uiteindelijke kinase activiteit, werd een constante waarde gekozen voor de volgende studies. Het bestuderen van de experimentele variabelen leverde enkele interessante gegevens op.

Ten eerste blijken veranderingen in experimenteer tijd zeer belangrijk voor de verschillende kinases, die elk op een verschillende wijze hierdoor beïnvloed werden. Hoofdstuk 2 laat zien dat het effect van tijd afhankelijk is van het stadium binnen de subcellulaire fractionering. Na decapitatie, wat gezien wordt als een vorm van volledige cerebrale ischemie, neemt de PLC activiteit toe in

zowel hersenweefsel als hersenhomogenaat. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de hoge intra-cellulaire calcium concentraties onder deze condities (Sun et al., 1990). Zowel  $\text{PIP}_2$  als PIP worden gehydrolyseerd waarbij DAG gevormd wordt (Dawson and Eichberg, 1965). De post mortem hydrolyse van het substraat voor  $\text{PIP}_2$  vorming (PIP) verklaard de afname in  $\text{PIP}_2$  vorming, en de post mortem toename in DAG concentratie verklaard de toename in PA vorming in de hier gebruikte assay (Hoofdstuk 2). Een verlenging van de experimenteer tijd na de subcellulaire fractionering, of voor de fosforylerings assay wordt gekarakteriseerd door lage calcium concentraties. De  $\text{PIP}_2$  en PA vorming zijn hierdoor toegenomen en de PIP vorming is hierdoor afgenomen. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door fosfomonoesterase activiteit waardoor de hoeveelheid PI toeneemt.

Hoofdstuk 3 laat zien dat de uiteindelijk in de fosforylerings assay gevormde hoeveelheid  $\text{PIP}_2$  sterk afneemt bij langere preïncubatie tijden. De vorming van PA en PIP worden niet beïnvloed door veranderingen in de preïncubatie tijd. Als dit een gevolg van fosfomonoesterase activiteit zou zijn, dan mocht verwacht worden dat de PIP vorming ook zou zijn toegenomen, wat dus niet het geval is. Een andere mogelijke verklaring voor dit verschijnsel is de regulatie van  $\text{PIP}_2$  vorming door eiwit fosforylatie. Jolles et al. (1980) laten namelijk een relatie zien tussen fosfoinositide fosforylatie en eiwit fosforylatie, en Dunkley en Robinson (1981) laten een afname in de fosforylatie van enkele membraan eiwitten zien t.g.v. langere preïncubatie tijden in een vergelijkbare subcellulaire fractie, analoog aan de afname in  $\text{PIP}_2$  fosforylatie zoals hier beschreven.

Ten tweede laat hoofdstuk 5 zien dat er regionale verschillen in PI, PIP en DAG kinase activiteit bestaan in de hersenen van de rat. Deze verschillen zijn waarschijnlijk een afspiegeling van een regionale verdeling van PLC activiteit. De mate van  $\text{PIP}_2$  en PA vorming, gemeten in zeven hersen gebieden van de rat, laten een negatieve correlatie zien. Een hoge basale PLC activiteit resulteert in een hoge DAG concentratie en, als gevolg hiervan, in een verhoogde PA vorming in de fosforylerings assay. Daarnaast resulteert een hoge basale PLC activiteit in verlaagde PIP en  $\text{PIP}_2$  concentraties en, als gevolg hiervan, in een verlaagde vorming van  $\text{PIP}_2$  in de fosforylerings assay. Tot nu toe zijn er echter nog geen gegevens bekend m.b.t. de regionale verdeling van basale PLC activiteit in de hersenen van de rat.

Ten derde leverde een onderzoek naar de subcellulaire distributie van de fosforylerings activiteiten van endogene lipiden een nog niet geïdentificeerd inositol lipide op, specifiek gelocaliseerd in de mitochondriële fractie. Na beoordeling van de elutie profielen verkregen na scheiding van de polaire kopgroep van het "nieuwe" inositol lipide op Dowex anionen wisselaar, bleek het onbekende inositol lipide in ieder geval geen fosfatidylinositol trisfosfaat of een lyso-fosfatidylinositol 4,5-bisfosfaat te zijn. Andere kandidaten zijn een fosfatidylinositol bisfosfaat isomeer, een glycosyl-fosfoinositide of een fosfatidylinositol pyrofosfaat. De vorming van fosfatidylinositol pyrofosfaten kan non-enzymatisch gekatalyseerd worden door twee-waardige metaalionen (Gumber and Lowenstein, 1986). Omdat mitochondriën relatief veel  $\text{Ca}^{2+}$

bevatten zou een stof als fosfatidylinositol 4-pyrofosfaat mogelijk gevormd kunnen worden. Fosfatidylinositol 4-pyrofosfaat heeft een  $R_f$  waarde op TLC die vergelijkbaar is met de  $R_f$  waarde van het onbekende inositol lipide. Verdere identificatie van dit onbekende inositol lipide vereist HPLC analyse van de chemisch gehydrolyseerde kopgroep of zelfs NMR analyse.

### - Experimenten met hersen materiaal van de mens.

PI kinase activiteit in cytosolaire fracties van de hersencortex van de mens neemt af met de leeftijd, in tegenstelling tot PIP kinase activiteit welke niet verandert (Hoofdstuk 8). Deze enzym activiteiten werden gemeten met exogene lipiden als substraat. De bevinding staat in contrast met de bevindingen gedaan in de hersencortex van de rat, waar geen leeftijds gerelateerde verschillen gevonden werden (Hoofdstuk 6). Deze discrepantie kan toegeschreven worden aan verschillende factoren. Ten eerste kunnen species verschillen een verklaring zijn. Ondanks het feit dat de rat wordt gezien als een valide model voor leeftijds gerelateerde veranderingen in fysiologische parameters in de mens, is het bekend dat meerdere processen in de verouderende rat verschillen t.o.v. de verouderende mens. Het blijft de vraag of de verouderende rat gezien kan worden als een valide model voor pathologische hersenveroudering bij de mens (AD). Ten tweede kunnen omgevings factoren het verouderende organisme beïnvloeden. Het feit dat oude mensen meer waarschijnlijk zijn blootgesteld aan zogenaamde 'biological life events' t.o.v. jonge mensen en t.o.v. ratten, welke onder constante condities worden gehouden en tevens goed verzorgd worden, kan ook een oorzaak zijn van het verschil in fosfoinositide metabolisme tussen verouderende ratten en mensen. 'Biological life events' zijn factoren die het optimaal functioneren van het brein aantasten, uitgezonderd de factoren die het functioneren van het brein in zeer sterke mate aantasten, zoals dementie (Houx et al., 1991). Oude ratten uit een inteelt stam, gehouden onder gestandaardiseerde condities met nauwelijks schadelijke invloeden uit hun omgeving zijn mogelijk dus geen adequaat model voor de verouderende mens. Echter, het nabootsen van 'biological life events' in de rat als model voor veroudering bij de mens zal hoogst waarschijnlijk stuiten op ethische bezwaren. Het gebruik van dieren die reeds gebruikt zijn in andere studies, waarin zij bijvoorbeeld een anaesthesie hebben ondergaan, zou daarom overwogen moeten worden.

PI kinase activiteit in cytosolaire fracties van de hersencortex van AD patienten is afgenomen vergeleken met die van op leeftijd gematchte controle personen. PIP kinase activiteit is niet veranderd (Hoofdstuk 7). In de AD patienten groep werd geen leeftijds gerelateerde afname gevonden van PI kinase en PIP kinase activiteit (Hoofdstuk 8). AD patienten met een leeftijd waarop de eerste symptomen van de ziekte werden waargenomen boven de 75 jaar hebben echter een hogere PI kinase activiteit (vergelijkbaar met controle waarden) dan AD patienten met een leeftijd van eerste symptomen beneden de 75 jaar. Deze resultaten suggereren dat PI kinase activiteit gebruikt kan worden om binnen de

AD patiënten populatie subgroepen te onderscheiden die verschillen in de leeftijd waarop de ziekte toegeslagen heeft. Deze interessante bevinding kan geïnterpreteerd worden als een indicatie voor heterogeniteit binnen de ziekte van Alzheimer, vergelijkbaar met de resultaten van een eerdere studie (Rossor et al., 1984) waarin enzym activiteiten verschillend waren in oude t.o.v. jonge AD patiënten. Deze resultaten geven aan dat meer onderzoek gedaan moet worden naar de biochemische differentiatie van AD subtypen.

De daling van PI kinase activiteit in AD wordt waarschijnlijk niet veroorzaakt door de aanwezigheid van een inhiberende component in AD cytosol, bijvoorbeeld een metaal ion, of door het verlies van een oplosbare activerende component in AD cytosol, bijvoorbeeld een cofactor. Chelatie experimenten en experimenten waarin AD cytosol en controle cytosol gecombineerd werden, gaven namelijk geen inhibitie of stimulatie te zien (Hoofdstuk 9). Van het enzym PI kinase kunnen drie subtypen onderscheiden worden (Carpenter and Cantley, 1990), elk met een andere subcellulaire localisatie, adenosine gevoeligheid, gevoeligheid voor detergentia, en veronderstelde functie. De sterkste afname in PI kinase activiteit werd aangetroffen in de cytosolaire fracties. De PI kinase activiteit in deze fracties werd geremd door Triton X-100 en was relatief ongevoelig voor adenosine, in tegenstelling tot de PI kinase activiteit in de integrale membraaneiwit fractie die gestimuleerd werd door Triton X-100 en geremd werd door adenosine. Het PI kinase in de cytosolaire fractie heeft de eigenschappen van het type I PI kinase, oftewel het PI 3-kinase, waardoor dit PI 3-kinase specifiek lijkt aangedaan in AD. Het uiteindelijke bewijs hiervoor dient te komen uit de identificatie van de produkten van de PI kinases welke actief zijn in de hersenen van AD patiënten en controles. Deze experimenten zullen deel uitmaken van vervolg studies.

Als type I PI kinase, of PI 3-kinase, specifiek is aangedaan in AD, dan kan eiwit tyrosine kinase activiteit hierbij betrokken zijn. Verschillende receptoren, die na stimulatie cytoskelet veranderingen in de cel induceren, bevatten een intrinsieke eiwit tyrosine kinase activiteit (opgesomd in Hoofdstuk 1). Stimulatie van deze receptoren resulteert in stimulatie van deze tyrosine kinase activiteit, gevolgd door de koppeling en activatie van PI 3-kinase en cytoskelet veranderingen. Deze mogelijke betrokkenheid van PI 3-kinase en tyrosine kinase activiteit bij de regulatie van cytoskelet veranderingen, samen met de daling van PI kinase activiteit (Hoofdstuk 7) en tyrosine kinase activiteit (Shapiro et al., 1991) in AD, duidt op een mogelijke betrokkenheid van deze enzymen bij de cellulaire pathologie van AD. 'Neurofibrillary tangles', welke één van de hoofd kenmerken zijn van AD, zijn namelijk hoofdzakelijk opgebouwd uit verkeerd gemetaboliseerde cytoskelet componenten.

Een toenemende hoeveelheid onderzoeks resultaten laat zien dat AD een ziekte van het gehele lichaam zou kunnen zijn, en niet een ziekte met alleen centrale effecten. Dit is de reden waarom PI kinase activiteit werd gemeten in bloed plaatjes van AD patiënten en op leeftijd gematchte controles. Voor deze studie werden bloed plaatjes gekozen omdat ziekte-specifieke abnormaliteiten in de hersenen, welke bijvoorbeeld optreden bij aandoeningen als de ziekte van



Parkinson, de ziekte van Huntington en depressie, ook worden aangetroffen in bloed plaatjes (Bush et al., 1991). Daarnaast bevatten bloed plaatjes een compleet fosfoinositide metaboliserend systeem, inclusief type 1 of PI 3-kinase, en zijn ze gemakkelijk te verkrijgen. De PI kinase activiteit in bloedplaatjes afkomstig van AD patienten en controle personen bleken echter niet van elkaar te verschillen. Om te concluderen dat veranderingen in PI kinase activiteit in de hersen cortex niet perifeer te zien zijn, moet echter meer onderzoek gedaan worden in meerdere perifere weefsels en/of cellen.

Concluderend kan gesteld worden dat de resultaten van dit onderzoek nieuwe informatie leveren over de neurochemische basis van hersenveroudering en AD. Drie enzymen, betrokken bij het fosfoinositide metabolisme, fosfatidylinositol kinase, fosfatidylinositol fosfaat kinase en diacylglycerol kinase, blijken te zijn aangedaan in hersenveroudering en/of AD. De micro-omgeving van deze enzymen blijkt heel belangrijk te zijn voor hun activiteit. De in dit proefschrift gebruikte operationalisatie, namelijk het onderscheiden van kinase activiteits metingen als functie van de leeftijd met en zonder de aanwezigheid van hun micro-omgeving, was om deze reden essentieel. Verder kan de afname in type 1 PI kinase activiteit in AD, met het oog op de veronderstelde relatie tussen dit kinase en cytoskelet turn-over processen, zeer relevant zijn voor de cellulaire pathologie van AD.

## Referenties

- Bush A.L., Beyreuther K., and Masters C.L. (1991) Circulating forms of amyloid precursor protein of Alzheimer's disease. In: *Alzheimer's disease: Basic mechanisms, diagnosis and therapeutic strategies* (Iqbal K., McLachlan D.R.C., Winblad B., and Wisniewski H.M., eds.), pp. 353-358. J.Wiley & Sons, Chichester, England.
- Carpenter C.L., and Cantley L.C. (1990) Phosphoinositide kinases. *Biochemistry* 29, 11147-11156.
- Dawson R.M.C., and Eichberg J. (1965) Diphosphoinositide and triphosphoinositide in animal tissue. Extraction, estimation and changes post mortem. *Biochem. J.* 96, 634-643.
- Dunkley P.R., and Robinson P.J. (1981) Calcium stimulated protein kinases from rat cerebral cortex are inactivated by preincubation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 102, 1196-1202.
- Gumber S.C., and Lowenstein J.M. (1986) Non-enzymic phosphorylation of poly-phosphoinositides and phosphatidic acid is catalysed by bivalent metal ions. *Biochem. J.* 235, 617-619.
- Houx P.J., Vreeling F.W., and Jolles J. (1991) Age-associated cognitive decline is related to biological live events. In: *Alzheimer's disease: Basic mechanisms, diagnosis and therapeutic strategies* (Iqbal K., McLachlan D.R.C., Winblad B., and Wisniewski H.M., eds.), pp. 353-358. J.Wiley & Sons, Chichester, England.
- Jolles J., Zwiers H., Van Dongen C.J., Schotman P., Wirtz K.W.A., and Gispen W.H. (1980) Modulation of brain poly-phosphoinositide metabolism by ACTH-sensitive protein phosphorylation. *Nature* 286, 623-625.
- Jolles J., Schrama L.H., and Gispen W.H. (1981) Calcium dependent turnover of brain polyphosphoinositides in vitro after prelabeling in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* 666, 90-98.
- Naeim F., and Walford R.L. (1985) Aging and cell membrane complexes: The lipid bilayer, integral proteins, and cytoskeleton. In: *Handbook of the biology of aging* (Finch C.E., and Schneider E.L., eds.), pp. 272-289. Van Nostrand Reinhold, N.Y.



- Rossor M.N., Iverson L.L., Reynolds G.P., Mountjoy C.Q., and Roth M. (1984) Neurochemical characteristics of early and late onset types of Alzheimer's disease. *Clin. Res.* **288**, 961-964.
- Shapiro I.P., Masliah E., and Saitoh T. (1991) Altered protein tyrosine phosphorylation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **56**, 1154-1162.
- Sun G.Y., Yoa F.-G., and Lin T.-N. (1990) Degradation of poly-phosphoinositides in brain subcellular membranes in response to decapitation insult. *Neurochem. Int.* **17**, 529-535.
- Van Rooijen L.A.A., Rossowska M., and Bazan N.G. (1985) Inhibition of phosphatidylinositol 4-phosphate kinase by its product phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **16**, 150-155.